

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 09072904 A

(43) Date of publication of application: 18.03.97

(51) Int. Cl.

G01N 33/53
G01N 33/543

(21) Application number: 07263415

(22) Date of filing: 04.09.95

(71) Applicant: KDK CORP

(72) Inventor: YAMAMOTO HIROSHI
KONO MASAO
DOI SHIGERU

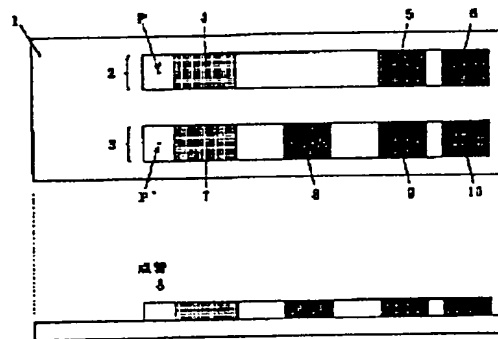
(54) DRY TEST PIECE FOR MEASURING VERY
SMALL AMOUNT OF HEMOGLOBIN A₁C

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To simultaneously measure hemoglobins(Hb) A, A₁C by arranging a developing layer having a hemolytic layer, an agglutination layer, a measuring layer and an absorbing layer and a developing layer having a hemolytic layer, a measuring layer and an absorbing layer on a support side by side and moving blood.

SOLUTION: A blood sample is deposited on hemolytic layers 4, 7 in a spot like state in the same quantity. The hemolytic layer 4 hemolyzes blood by a hemolytic agent and HbA is developed by a developing soln. added to a development start point P to be caught by the anti-HbA antibody or ion exchange substance fixed to a measuring layer 5 and the residual developing soln. is absorbed by an absorbing layer 6. The hemolytic layer 7 hemolyzes blood by a hemolytic agent to modify the same by a modifier and HbA containing HbA₁C is adsorbed by fine particles. HbA is developed by the developing soln. added to a development start point P' and reacted with the anti-HbA₁C antibody contained in an agglutination layer 8 to be agglutinated. This reaction product is caught by a measuring layer 9 and the residual developing soln. is absorbed by an absorbing layer 10. The degrees of pigmentation of fine particles corresponding to HbA and HbA₁C caught by the layers are optically measured and the quantities of HbA and HbA₁C and the ratio of them are calculated from the measuring result.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO



THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-72904

(43) 公開日 平成9年(1997)3月18日

(51) IntCl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	K
33/543	5 2 1		33/543	5 2 1

審査請求 未請求 請求項の数7 書面 (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平7-263415

(22) 出願日 平成7年(1995)9月4日

(71) 出願人 000141897

株式会社京都第一科学

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

(72) 発明者 山本 博司

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

(72) 発明者 河野 昌雄

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

(72) 発明者 土井 茂

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

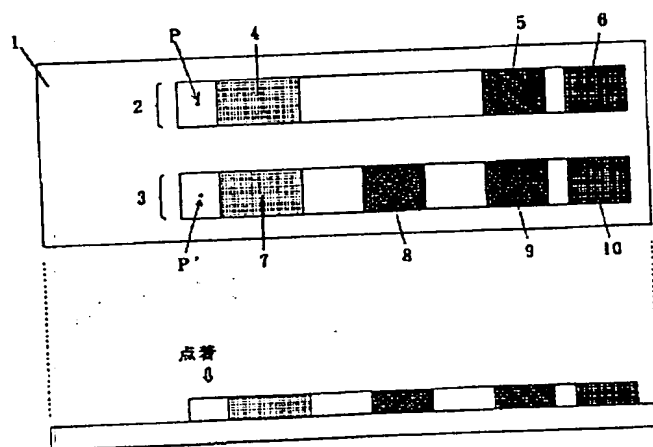
株式会社京都第一科学内

(54) 【発明の名称】 微量なヘモグロビン▲A1c▼測定用乾式試験片

(57) 【要約】 (修正有)

【解決手段】 (i) 溶血剤を塗布した溶血層4、(i i) ヘモグロビンAを捕捉する機能を有する測定層5、(i i i) 展開残液を吸収する吸収層6、をこの順序で有する一個の連続した展開層2と、(i v) 溶血剤、変性剤、微粒子を塗布した溶血層7、(v) 微粒子一個につき複数個の抗ヘモグロビンA_{1c}抗体が固定化されている微粒子を含む凝集層8、(v i) 凝集微粒子のみを捕捉する測定層9、(v i i) 展開残液を吸収する吸収層10、をこの順序で有する一個の連続した展開層3とが、一個の支持体1上に並べて設置してあり、i から i i i までの間並びに i v から v i i までの間を液体が移動しうることを特徴とする、血液検体用乾式測定用具。

【効果】大型の分析装置を用いず、前処理を要せずに患者自身が在宅でも簡単な操作でヘモグロビンA_{1c}を測定できる。さらに、目的物質を標識しないので、標識化による抗体の変性の危険性もない。



【特許請求の範囲】

【請求項1】血液検体中のヘモグロビンA_{1c}を測定するための乾式試験片であって、以下のiからivの構成すなわち

i) 溶血剤、変性剤、微粒子を塗布した溶血層

ii) 微粒子一個につき複数個の抗ヘモグロビンA_{1c}抗体が固定化されている微粒子を含む凝集層

iii) 凝集した微粒子を捕捉する機能を有する測定層

iv) 展開残液を吸収する吸収層

をこの順序で有する一個の連続した展開層と、以下のvからviiの構成すなわち

v) 溶血剤を塗布した溶血層

vi) ヘモグロビンAを捕捉する測定層

vii) 展開残液を吸収する吸収層

をこの順序で有する一個の連続した展開層とが、一個の支持体上に並べて設置してあり、iからivまでの間並びにvからviiまでの間を液体が移動しうることを特徴とする、血液検体用試験片。

【請求項2】溶血層における微粒子が、ヘモグロビンと光学的に区別して検出する色に着色されている、特許請求の範囲第1に記載の試験片。

【請求項3】測定層での凝集微粒子の捕捉の方法が、濾過材による濾過によるものである、特許請求の範囲第1又は2項に記載の試験片。

【請求項4】血液検体中のヘモグロビンA_{1c}を測定するための試験片であって、以下のiからvの構成すなわち

i) 溶血剤、変性剤、微粒子を塗布した溶血層

ii) 微粒子一個につき複数個の抗ヘモグロビンA_{1c}抗体が固定化されている微粒子を含む凝集層

iii) 凝集した微粒子を捕捉する機能を有する第一の測定層

iv) 凝集していない微粒子を捕捉する機能を有する第二の測定層

v) 展開残液を吸収する吸収層

をこの順序で有する一個の連続した展開層からなり、iからvまでの間を液体が移動しうることを特徴とする、血液検体用試験片。

【請求項5】溶血層における微粒子が、特定物質と光学的に区別して検出する色に着色されている、特許請求の範囲第4に記載の試験片。

【請求項6】測定層での凝集微粒子の捕捉の方法が、濾過材による濾過によるものである、特許請求の範囲第4又は5項に記載の試験片。

【請求項7】ivの第二の測定層がvの吸収層を兼ねている、特許請求の範囲第5から9項のいずれかに記載の試験片。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、検体となる血中のヘモ

グロビンA (HbAと略する) と、そのグリコヘモグロビンであるヘモグロビンA_{1c} (HbA_{1c}と略する) とを同時に簡易測定するための乾式の試験片に関する。特に、検体中にHbA_{1c}が非常に少ない場合に有用な試験片に関する。

【0002】

【従来の技術】血中のヘモグロビンに糖が結合(グリコシル化)したグリコヘモグロビンは、その濃度が過去1~2ヶ月間の平均的な血中糖濃度を反映するため、糖尿病の診断あるいは糖尿病の経過観察に適した指標として広く利用されている。

【0003】グリコヘモグロビンを測定する場合には、全体のヘモグロビン量を対照とした際のグリコヘモグロビン量の比率で示される。ヘモグロビンの種類(ヘモグロビンA, S, CおよびE)のうち、ヘモグロビンA (HbA) 中の特定のグリコシル化ヘモグロビンである、ヘモグロビンA_{1c} (HbA_{1c}) の割合を指標として用いることが臨床的に一般化されており、HbA全体に対するHbA_{1c}の比率で示すと、通常約4~6%がその目安とされている。

【0004】このグリコヘモグロビンの測定法としては、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー法、ボロン酸アフィニティクロマトグラフィー法、イムノアッセイ法などが知られているが、中でも所要時間や分離性などの点からイオン交換クロマトグラフィー法が主流となっている。しかし、最近では特異性の高い『抗体』を用いたイムノアッセイ法でも測定されるようになってきた。

【0005】従来のグリコヘモグロビンのイオン交換クロマトグラフィー法およびイムノアッセイ法では、比較的大型の分析装置を必要とし、大きな病院の検査室や検査センターで測定が行なわれている。

【0006】イムノアッセイ法は、使用する抗体の特異性が高いため、イオン交換クロマトグラフィー法において問題とされる不安定型グリコヘモグロビン、カルバミル化ヘモグロビン、アセトアルデヒド化ヘモグロビン、およびアセチル化ヘモグロビンなどの影響を受けず、迅速かつ検体処理能力が高い長所がある。

【0007】しかし、グリコヘモグロビンに対する特異抗体は、ヘモグロビンとの化学構造の相違する部位(つまりヘモグロビンに糖の結合した部分)をエピトープとしている上に、HbA_{1c}の場合は特にその部位が十分に露出していないため、イムノアッセイ法を行う際、多くの場合その部位を露出させるための溶血および/又は変性操作が必要である。

【0008】イムノアッセイ法を応用したもので、血中ヘモグロビン(ヘモグロビンA, S, CおよびE)を目視により判定する使い捨てタイプの乾式検査具(Screening 3, 67~76, 1994)も知られている。この乾式検査具は患者自身でも測定することが可能

であるが、前処理として溶血操作を必要とし、HbA_{1c}等のグリコヘモグロビンの測定用ではない。前処理を患者自身が行う場合、操作の煩雑さの他に汚染も問題である。

【0009】HbA_{1c}等を測ることができ、かつ検体を前処理せずに測定可能な乾式試験片が開発されればそのメリットは極めて大きいわけであるが、現在まだ知られていない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、溶血および／又は変性の前処理操作を必要とせず、大型の分析装置を使わずに小型機器を用いて、検体数の少ない中小の病院や開業医、又は患者自身でも簡単な操作でHbAとHbA_{1c}とを同時に直接測定できる乾式試験片を提供することを目的とする。また、検体中にHbA_{1c}が特に少ない場合でも良好に測定できる乾式試験片を提供することも目的とする。

【0011】上記目的は、以下の構成すなわち

i) 溶血剤、変性剤、微粒子を塗布した溶血層
 ii) 微粒子一個につき複数個の抗HbA_{1c}抗体が固定化されている微粒子を含む凝集層
 iii) 凝集した微粒子を捕捉する機能を有する測定層
 iv) 展開残液を吸収する吸収層
 をこの順序で有する一個の連続した展開層と、以下のvからviiiの構成すなわちv) 溶血剤を塗布した溶血層
 vi) ヘモグロビンAを捕捉する測定層
 vii) 展開残液を吸収する吸収層
 をこの順序で有する一個の連続した展開層とが、一個の支持体上に並べて設置してあり、iからivまでの間およびvからviiiまでの間を液体が移動しうる試験片で解決できる。

【0012】また、上記目的は、以下の構成すなわち

i) 溶血剤、変性剤、微粒子を塗布した溶血層
 ii) 微粒子一個につき複数個の抗HbA_{1c}抗体が固定化されている微粒子を含む凝集層
 iii) 凝集した微粒子を捕捉する機能を有する第一の測定層
 iv) 凝集しない微粒子を捕捉する機能を有する第二の測定層
 v) 展開残液を吸収する吸収層
 をこの順序で有する一個の連続した展開層からなり、iからvまでの間を液体が移動しうる乾式試験片でもまた解決できる。

【0013】血液検体を溶血層へ点着し、展開液等で展開させた後、測定層において光学的に測定してHbAとHbA_{1c}の量を同時に求め、それぞれの値を用いてHbAに対するHbA_{1c}の比率を算出することができる。本発明の試験片で測定する際の血液検体としては、全血は勿論のこと、分離された赤血球も使用できる。

【0014】検体中にHbA_{1c}が微量しか含まれずと

も、凝集層中の抗HbA_{1c}抗体を、一個の微粒子につき複数の抗HbA_{1c}抗体が固定化されている状態でその微粒子を凝集層中に含ませることにより感度を上げることができる。詳細は後述する。

【0015】免疫凝集反応は、市販の着色ビーズを使用するので、色素等で抗体を標識する必要がない。目的物質を標識しないので、標識化による抗体の変性の危険性もない。このとき、溶血層における微粒子は、ヘモグロビンと光学的に区別して検出しうる色に着色されているものと、検出時に都合がよい。

【0016】測定層での凝集微粒子の捕捉の方法は、濾過することで捕捉することが一般的であるが、抗体やイオン交換樹脂を使用する方法も使用できる。

【0017】

【発明の実施の形態】図1は、本発明による試験片の一つの態様の平面図と側面図である。これを試験具Aとする。

【0018】支持体1の上に、展開可能な材質からなる2つの展開膜2および3が装着されている。本発明では、液を通すことの出来る材質を「展開膜」と呼び、その展開膜へ溶血層や凝集層などの構成層を設けたものを「展開層」と呼ぶことにする。一方の展開膜2には順次、展開開始点Pと、溶血剤を塗布した溶血層4と、抗HbA抗体またはイオン交換物質を固定化した測定層5と、展開残液を吸収させる吸収剤からなる吸収層6とが設けられている。他方の展開膜3には順次、展開開始点P'と、溶血剤と変性剤と微粒子を塗布した溶血層7と、微粒子一個につき複数個の抗HbA_{1c}抗体が固定化されている微粒子を塗布した凝集層8と、凝集微粒子のみを捕捉しうる測定層9と、展開残液を吸収させる吸収剤からなる吸収層10とが設けられている。図中の側面図は、展開膜3を長方向に横切る断面図である。

【0019】使用する際には、まず試験具Aの溶血層4と溶血層7へ血液検体を同量づつ点着することにより始まる。溶血層4において血液が溶血され、次いで展開液を展開開始点Pに加えてHbAを展開させる。展開されたHbAは測定層5に固定化されている抗Hb抗体又はイオン交換物質に捕捉され、展開残液は吸収層6に吸収される。一方、溶血層7において血液は溶血と同時に変性され、HbA_{1c}を含むHbAは微粒子に吸着される。引き続き展開液を展開開始点P'に加えると、その微粒子は展開され、微粒子は凝集層8に塗布されている抗HbA_{1c}抗体と反応して凝集し、凝集した微粒子は測定層9に捕捉され、凝集していない微粒子を含む展開残液は吸収層10に吸収される。測定層5に捕捉されたHbAの着色度と、測定層9に捕捉された微粒子自身(HbA_{1c}に相当)の着色度とを光学的方法によって測定する。その結果からそれぞれHbAおよびHbA_{1c}量を求めた後、HbAに対するHbA_{1c}の比率を算出する。

【0020】ここで、もしも検体中にHbA_{1c}が非常に少ない場合、微粒子一個に吸着するHbA_{1c}がたったの一個という状況になる。これでは、普通に抗HbA_{1c}抗体を単品で塗布している凝集層においては、抗HbA_{1c}抗体を介して微粒子どうしが繋がらず、結果として凝集反応が起こらない。そういった場合でも、本発明の試験具Aは、複数の抗HbA_{1c}抗体を固定化した微粒子を中心に、HbA_{1c}が一個吸着している微粒子が集まり、凝集が起こる。抗HbA_{1c}抗体を固定化した微粒子は、溶血層に含まれる微粒子と同質のものに抗HbA_{1c}抗体を公知の方法（「酵素免疫測定法」医学書院、1987年）等により固定化したものが使用できる。

【0021】ここで、各構成の材質としてはいずれも公知の物質でよいが、具体的には次のようなものである。

【0022】支持体は、光透過性でも光非透過性でも良いが、展開終了後の測定を支持体下部から行うのであれば、透明なポリエチレンテレフタレートなどが望ましい。その他の例；ポリスチレン、ポリエステル、酢酸セルロースなど

【0023】液をクロマトさせる、展開層全体を形成している展開膜の材質は、液を通しやすい物質が望ましい。例えば、濾紙といったセルロース、酢酸セルロース、ニトロセルロース、ガラスファイバーなどがある。

【0024】吸収剤の条件としては、展開残液を吸収するのに十分な細孔容積を有するマトリックス的な物質か、乾燥ゲルといった吸水性に優れた物質が好ましい。その他の例：セルロース、酢酸セルロース、ポリアクリル酸、ポリビニールアルコールなど

【0025】凝集した微粒子を捕捉するための測定層は、濾過材を用いて濾過することで捕捉することが一般的であるが、抗体やイオン交換樹脂を使用する方法もある。濾過材を用いる際の材質の例としては、ポリテトラフルオロエチレン、ポリスルホン、ポリプロピレン、ポリビニリデンジフロライド、セルロース混合エステルなどがある。

【0026】目的物質を吸着させるための微粒子と、複数の抗HbA_{1c}抗体を固定化した微粒子は、一般の免疫凝集反応で使用される市販の着色ラテックスや、着色または無着色金属コロイド（金、銀、銅）など（着色は、ヘモグロビンの色と光学的に区別して測定できるもの）が使用できる。

【0027】支持体上へ展開膜を配置する方法としては、細長くテープ状に加工した展開膜を両面テープや接着剤やホットメルトを用いて物理的に固定する。テープ状に加工する際の幅・長さは、クロマトグラフィー技術に準ずる。

【0028】溶血剤としてはサポニンが有力であるが、さらに界面活性剤も使用でき、その種類としては、ポリソルベート、ポリエチレングリコール-p-イソオクチ

ルエーテルなどが挙げられる。その中でも溶血能の点から、トリトンX-100が市販品として特に望ましい。

【0029】溶血層に塗布される変性剤は、HbA_{1c}を変性させてHbAとの化学構造の相違する部位（つまり糖結合部分）を露出させ、抗HbA_{1c}抗体が免疫的に認識し易くする役割を有する。チオシアン酸塩のような酸や、プロテアーゼのような加水分解酵素が好ましいが、環境を単に酸性にするのみでも良い。

【0030】展開に用いる展開液としては、通常のイムノアッセイ法に使用されるような、少量の蛋白質、塩、界面活性剤などを含む緩衝液が望ましく、一例としては、0.1%ウシ血清アルブミンと、0.01%トリトンX-100と、0.9%塩化ナトリウムとを含む0.1Mリン酸緩衝液が挙げられる。展開層に各層を設けるために、展開膜へ各種試薬を含浸・塗布または結合させる。手法としては当業者間で公知の方法で良く、施すべき物質を1種以上の溶液に溶かし込み、塗り付けることで含浸したり、インクジェットプリンターで噴霧したり、化学的に結合する（「酵素免疫測定法」医学書院、1987）ことがされる。いずれにしても、最終的には乾燥させる。

【0031】凝集層に塗布された抗HbA_{1c}抗体と、測定層に固定化された抗HbA抗体は、ポリクローナル抗体かモノクローナル抗体のいずれも使用できる。

【0032】HbAを測定する方の展開膜の測定層に固定化されたイオン交換物質は、ジエチルアミノエチルセルロースやカルボキシメチルセルロースなどが使用できる。

【0033】図2は、本発明による試験片のもう一つの態様の平面図である。これを試験片Bとする。

【0034】支持体21の上に、液を展開可能な材質でできた展開膜22を装着し、展開膜22に順次、溶血剤・微粒子および変性剤を塗布した溶血層23と、微粒子一個につき複数の抗HbA_{1c}抗体が固定化されている微粒子を塗布した凝集層24と、凝集微粒子を捕捉できる孔径を有する濾過剤でできた測定層25と、凝集しない微粒子を捕捉する濾過剤でできた測定層26と、展開残液を吸収する吸収剤からなる吸収層27とが設けられている。

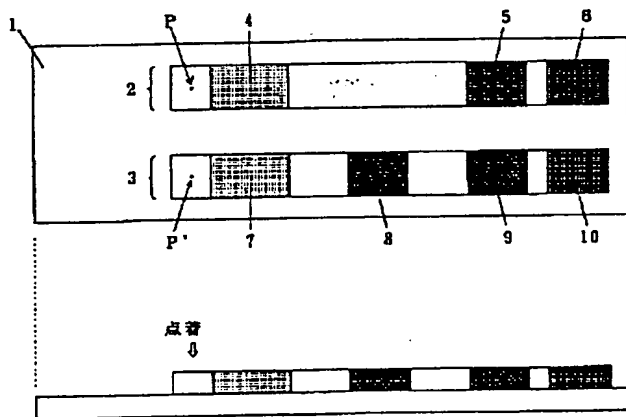
【0035】試験片Bの溶血層23に血液検体を点着すると、検体は溶血および変性され、HbA_{1c}を含むHbAは微粒子に吸着される。次いで展開液を展開開始点Pに加えると、その微粒子は凝集層24に塗布されている抗HbA_{1c}抗体と免疫反応して凝集する。つまりその凝集塊は、HbAのうち、HbA_{1c}のみが原因で凝集している。続いて凝集した微粒子（HbA_{1c}由来）は孔径の大きい濾過膜である測定層25に捕捉され、一方凝集していない微粒子（HbA由来）は孔径の小さい濾過膜である測定層26に捕捉され、その他の展開残液は吸収層27に吸収される。測定層25および26中の

Hb Aの着色度と、測定層25に捕捉された微粒子自身の着色度(Hb A₁。量に相当)とを光学的に測定し、その結果からそれぞれHb AおよびHb A₁。を求めた後、Hb Aに対するHb A₁。の比率を算出する。抗Hb A₁。抗体固定化微粒子の働きで、検体中にHb A₁。が非常に少なくとも凝集反応を起こすために、測定が可能である。

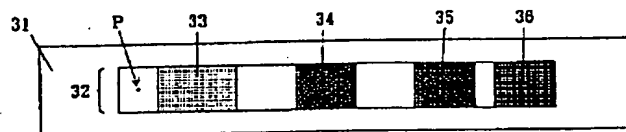
【0036】図3は、本発明による試験片のもう一つの態様の平面図である。これを試験片Cとする。

【0037】支持体31の上に液を展開可能な材質でできた展開層32を装着し、展開層32に順次、溶血剤・微粒子および変性剤を塗布した溶血層33と、微粒子一個につき複数個の抗Hb A₁。抗体が固定化されている微粒子を塗布した凝集層34と、凝集微粒子のみを捕捉しうる濾過膜でできた測定層35と、展開残液を吸収させる吸収剤からなる吸収層36とを設けてある。これは第2図の試験片Bのうち、凝集しない微粒子を捕捉する濾過材でできた測定層26と、展開残液を吸収する吸収剤からなる吸収層27とを一つにまとめた、図2の試験片Bの別態様というべきものである。使用方法是試験片Bと同じで、測定対象物質Hb A₁。が関与する微粒子は凝集して測定層35に捕捉され、凝集していない微粒子を含む展開残液は吸収層36に吸収される。このとき、測定層35と吸収層36中のHb Aの着色度と、測定層35に捕捉された微粒子の着色度を光学的方法により分別測定して、その結果からHb AおよびHb A₁。を求めた後、Hb Aに対するHb A₁。の比率を算出する。抗Hb A₁。抗体固定化微粒子の働きで、検体中に

【図1】



【図3】



Hb A₁。が非常に少なくとも凝集反応を起こすために、測定が可能である。

【0038】

【発明の効果】本発明による乾式試験片を用いると、大型の分析装置を用いず、しかも前処理を要せずに患者自身が在宅でも簡単な操作でHb AとHb A₁。を同時に測定できる。また、免疫凝集反応を利用し、市販の着色ビーズを使用するので抗体を標識する必要もない。さらに、目的物質を標識しないので、標識化による抗体の変性の危険性もない。また、検体中にHb A₁。が非常に少なくとも凝集反応を起こすために、測定が可能である。

【0039】

【図面の簡単な説明】

【図1】は、本発明の試験片Aの平面図と側面図である。

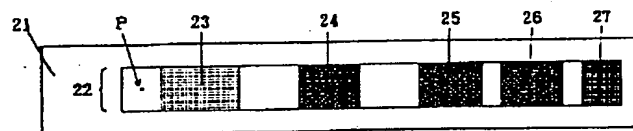
【図2】は、本発明の試験具Bの平面図である。側面図は図1と同じなので省略した。

【図3】は、図2の試験具の別態様(試験具C)の平面図である。側面図は図1と同じなので省略した。

【符号の説明】

- 1, 21, 31 : 支持体
- 2, 3, 22, 32 : 展開層
- 4, 7, 23, 33 : 溶血層
- 8, 24, 34 : 凝集層
- 5, 9, 25, 26, 35 : 測定層
- 6, 10, 27, 36 : 吸収層
- P, P' : 展開開始点

【図2】



THIS PAGE BLANK (USPTO)